

УДК 577.15 (088.8)

І. І. Романовська¹, О. П. Сотникова², С. С. Декіна¹, Є. А. Шестеренко¹ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ¹, ОДЕСА
ІНСТИТУТ ОЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМЕНІ В. П. ФІЛАТОВА НАМН УКРАЇНИ², ОДЕСА

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Й ОФТАЛЬМОНЕШКІДЛИВІСТЬ ОЧНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ МАЗІ З ЛІЗОЦИМОМ

Досліджено фізико-хімічні властивості очної лікарської мазі з лізоцимом пролонгованої бактеріолітичної дії з використанням як основи безводного ланоліну і вазеліну (1:4). Показано повне збереження гідролітичної активності ферменту (20 000 од./г мазі) і фізико-хімічних характеристик лікарської форми протягом 3 років зберігання (4 °С). Дослідження гострої офтальмотоксичності препарату і кон'юнктивальної проби на очах кролів і морських свинок показало, що 0,25 % мазь лізоциму не чинить місцевоподразнювальної і алергізувальної дій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: очна мазь, лізоцим, офтальмотоксичність, ланоліно-вазелінова основа.

ВСТУП. Очні лікарські форми займають особливе місце серед широкого асортименту препаратів, які застосовують у практичній офтальмології. Захворюваність населення України на очну патологію, за статистичними даними, становить 56 % у великих містах і близько 49 % в сільській місцевості [4]. Провідне місце серед них займають запальні інфекційні ураження очей, збудниками яких є багато мікроорганізмів і деякі віруси.

Враховуючи зростання резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, перспективним є використання лізоциму, ферменту класу гідролаз, який має протизапальну, імунотропну, бактеріолітичну й адаптаційно-трофічну дії. Очні лікарські препарати у вигляді мазей або гелей характеризуються пролонгованим терапевтичним ефектом, високою біодоступністю, досить легкою технологією виготовлення, безпечністю і простотою застосування.

Для приготування очних мазей широко застосовують основу, що складається з ланоліну безводного і вазеліну [1]. У даній основі ланолін сприяє фіксації мазі на слизовій, а також більш повному всмоктуванню лікарських речовин, а вазелін має достатню стійкість до впливу зовнішнього середовища, індиферентність відносно багатьох лікарських речовин, відсутність подразнювальної дії [2, 3, 6].

Метою даної роботи було вивчити фізико-хімічні властивості очної лікарської мазі з лізоцимом і офтальмонешкідливість препарату.

© І. І. Романовська, О. П. Сотникова, С. С. Декіна, Є. А. Шестеренко, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували комерційний препарат лізоциму яєчного білка КФ 3.2.1.17 ("Merck", Німеччина), ланоліну безводного, вазеліну "Для очних мазей", що не містить відновлювальних речовин.

Мазь готували таким чином: 1 г ланоліну і 4 г вазеліну розміщували у фарфоровій чашці й нагрівали на водяній бані; розплавлену мазеву основу проціджували через кілька шарів марлі, фасували в сухі простерилізовані скляні флакони, закупорювали і стерилізували в повітряному стерилізаторі при 180 °С протягом 30 хв; у готову мазеву основу (5 г) поступово вмішували водний розчин лізоциму, що містить 12,5 мг ферменту, до отримання гомогенної в'язкої суміші (без крапельок води) і зберігали при температурі 3–5 °С в захищеному від світла місці.

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом, використовуючи як субстрат ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) [5]. За одиницю активності лізоциму брали кількість ферменту, що сприяє зниженню оптичної густини суспензії клітин на 0,001 за 1 хв.

Вміст білка і динаміку його виходу з препарату контролювали методом Лоурі-Хартрі [8]. рН-оптимум лізоциму, включеного в мазеву основу і вільного, визначали, доливаючи до рівних за активністю проб розчин субстрату і буферні розчини з різними значеннями рН (2,0–10,0) з наступним визначенням активності за вищевказаною методикою. Температурний оптимум препарату визначали в однакових за активністю пробах вільного і

включеного в мазеву основу лізоциму при температурі 20–80 °С в Na-фосфатному буферному розчині 0,1 М, рН 6,2. Термін придатності препарату оцінювали протягом 3 років за показниками його гідролітичної активності та фізико-хімічних властивостей.

Офтальмонешкідливість 0,25 % очної мазі лізоциму вивчали з метою встановлення наявності, характеру і ступеня вираження можливого її токсичного впливу на зовнішні структури ока. Оцінювали показники гострої офтальмотоксичності й дані кон'юнктивальної проби (алергізувальна дія). Дослідження проведено згідно з вимогами GLP, методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України (2003). Досліди виконано на 12 статевозрілих кролях породи шиншила обох статей масою 2,2–2,8 кг і 6 морських свинках масою 300–350 г. Гостру офтальмотоксичність вивчали в режимі багаторазового закладання смужки 0,25 % мазі лізоциму довжиною 0,5–1 см у нижнє кон'юнктивальне склепіння правого ока кролика через кожну годину протягом 6 год. Ліве око використовували як інтактний контроль. Контрольній групі тварин у праве око закладали мазеву основу. Показниками гострої офтальмотоксичності слугували дані про вплив випробуваної мазі на структури переднього відділу ока – рогівку, райдужну оболонку і кон'юнктиву (місцевоподразнювальна дія), які оцінювали за шкалою Дрейза (в балах). Цілісність епітелію рогівки визначали за флуоресцеїновою пробою. Всі досліджувані показники реєстрували при зовнішньому огляді та методом біомікроскопії на щілинній лампі ЩЛ-2Б перед початком введення очної мазі, після закінчення її використання і через 24 год після початку застосування. Кожен кролик враховувався окремо за сумою балів у трьох блоках: “рогівка + райдужка + кон'юнктива”. Тест Дрейза оцінювали як позитивний, якщо

сума балів перевищувала 20. Алергізувальну дію вивчали на морських свинках з метою з'ясування можливої сенсibiliзувальної дії очної мазі; в праве око закладали 0,25 % мазь лізоциму, а в ліве (контрольне) – мазеву основу. Можливу реакцію враховували при зовнішньому огляді через 15 хв і через 24–48 год, оцінюючи її в балах. Пробу вважали позитивною, якщо після введення мазі реєстрували реакцію в 1 бал і вище [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для дослідження було підготовлено 35 флаконів, кожен з яких містив 5 г 0,25 % мазі лізоциму, відповідно до концентрації ферменту, який використовують в офтальмології. У зразках визначали вміст ферменту, білка в препараті на момент виготовлення і в процесі зберігання. Характеристику мазі наведено в таблиці 1.

Швидкість і повноту вивільнення лізоциму з мазі показано на рисунку. Встановлено, що максимальний вихід ферменту спостерігається через 5 годин інкубування і становить $(49,2 \pm 1,3)$ %. Подальше витримування мазі протягом доби не приводить до повного вивільнення білка або збільшення гідролітичної активності, що, очевидно, пов'язано зі здатністю ланоліну до емульгування та інгібуючим впливом маzewої основи.

При встановленні терміну придатності досліджуваного препарату показано повне збереження гідролітичної активності ферменту і всіх фізико-хімічних характеристик очної форми протягом 3 років зберігання (табл. 2).

Офтальмонешкідливість 0,25 % очної мазі лізоциму вивчали з метою встановлення наявності, характеру і ступеня вираження можливого її токсичного впливу на зовнішні структури ока. На всіх етапах експерименту і після закінчення шестигодинного застосування мазі у кролів дослідної групи стан рогівки і рай-

Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості мазі лізоциму

Властивості	Характеристика
Згідно з класифікацією за сферою використання за складом за характером впливу на організм за типом дисперсної системи за типом маzewої основи	Мазь для нанесення на слизову оболонку. Очні мазі. Складна. Місцева. Гетерогенна комбінована. Гідрофобна. Вуглеводнева
Колір	Кремний
Маса, г	5
Гідролітична активність*, од.	$20\,000 \pm 1500$
рН-оптимум дії	6,0–6,5
Термооптимум, °С	55
Вміст білка, %	55
Активність при 37 °С	75 % від вих.

Примітка. * – Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, Т=55 °С.

Таблиця 2 – Збереження активності мазі лізоциму

Час зберігання, міс.	Гідролітична активність*	
	од./мг	%
Після включення	20773±1038	100,0
1	20770±1039	99,98
3	20673±1034	99,52
6	19215±961	92,50
12	20038±1002	96,46
36	20138±1052	96,94

Примітка. * – гідролітична активність лізоциму при pH 6,2, T=55 °C.

дужної оболонки зберігався на вихідному фізіологічному рівні. Мазева основа (контроль) не викликала симптомів подразнення з боку кон'юнктиви повік кролів.

Аналіз результатів місцевої реакції на застосування препарату (дослідна група) показав, що в жодного з кролів у блоці "рогівка + райдужка + кон'юнктива" сумарна оцінка не перевищувала 6 балів. Таким чином, тест Дрейза є негативним і мазь лізоциму не має місцевоподразнювальної дії.

За результатами кон'юнктивальної проби у морських свинок, після однократного закладання мазі лізоциму (в праве око) при зовнішньому огляді стан обох очей відповідав фізіологічній нормі. Через 15 хв і через 24–48 год не виявлено будь-яких видимих змін кон'юнктиви очного яблука і склери, що дозволяє оцінювати кон'юнктивальну пробу як негативну і свідчить про відсутність алергізувальної дії очної мазі.

ВИСНОВКИ. Розроблено 0,25 % очну мазь лізоциму на ланоліно-вазелиновій основі з

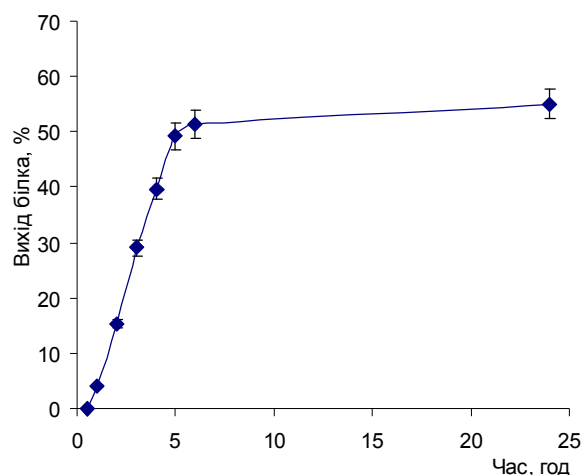


Рис. Динаміка виходу лізоциму з ланоліно-вазелинової мазевої основи.

високим збереженням гідролітичної активності та фізико-хімічних властивостей протягом тривалого терміну зберігання (3 роки). Дослідження офтальмонешкідливості препарату показали відсутність місцевоподразнювальної та алергізувальної дій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Х. : РІПЕГ, 2001. – 556 с.
2. Николаев Н. П. Технология мазей / Н. П. Николаев. – К. : МОРИОН, 1998. – 250 с.
3. Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки : наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р.
4. Салдан В. И. Фармакологическое исследование совместного применения гумината и сульфацила натрия при заболеваниях роговицы : автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук / В. И. Салдан. – Одесса, 2008. – 19 с.
5. Ткачук Н. И. Биохимические изменения в тканях полости рта крыс при воспроизведении

стоматита с помощью пчелиного яда / Н. И. Ткачук, В. Я. Скиба, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2007. – № 6. – С. 16–20.

6. Фармацевтические и биологические аспекты мазей : монография / [И. М. Перцев, А. М. Котенко, О. В. Чуешов и др.]. – Х. : Вид-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 285 с.

7. Экспериментальное изучение безвредности и фармакологической активности глазных лекарственных средств : методические рекомендации / [Л. А. Чайка, А. Г. Ципкун, Т. Б. Гайдамака и др.]. – К., 2003. – 43 с.

8. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // Anal. Biochem. – 1972. – 48, № 1. – P. 422–427.

И. И. Романовская¹, Е. П. Сотникова², С. С. Декина¹, Е. А. Шестеренко¹
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ¹, ОДЕССА
ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ И ТКАНЕВОЙ ТЕРАПИИ ИМЕНИ В. П. ФИЛАТОВА НАМН УКРАИНЫ², ОДЕССА

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОФТАЛЬМОБЕЗВРЕДНОСТЬ ГЛАЗНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ МАЗИ С ЛИЗОЦИМОМ

Резюме

Исследованы физико-химические свойства глазной лекарственной мази с лизоцимом пролонгированного бактериолитического действия с использованием в качестве основы безводного ланолина и вазелина (1:4). Показано полное сохранение гидролитической активности фермента (20 000 ед./г мази) и физико-химических характеристик лекарственной формы на протяжении 3 лет хранения (4 °С). Исследование острой офтальмотоксичности препарата и конъюнктивной пробы на глазах кроликов и морских свинок показало, что 0,25 % мазь лизоцима не обладает местнораздражающим и аллергизирующим действиями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глазная мазь, лизоцим, офтальмотоксичность, ланолино-вазелиновая основа.

I. I. Romanovska¹, O. P. Sotnykova², S. S. Dekina¹, Ye. A. Shesterenko¹
O. V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE¹, ODESA
FILATOV INSTITUTE OF EYE DISEASES AND TISSUE THERAPY², ODESA

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND OPHTHALMOINNOCENCE OF OCULAR MEDICINAL OINTMENT WITH LYSOZYME

Summary

There were studied the physico-chemical properties of ocular medicinal ointment with lysozyme is produced, possessing prolonged bacteriolytic action, using as base anhydrous lanolin and vaseline (1: 4). The total retaining of enzyme hydrolytic activity (2000 U/g of ointment) and physico-chemical properties of medicinal form during 3 years of storage (4 °C) is shown. Investigation of acute ophthalmotoxicity of preparation and conjunctival test on eyes of rabbits and guinea pigs has shown, that 0,25 % lysozyme ointment has no locally irritative and allergenic action.

KEY WORDS: ocular ointment, lysozyme, ophthalmotoxicity, lanolin-vaseline base.

Отримано 27.06.12

Адреса для листування: І. І. Романовська, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: romairina@gmail.com.